

**ANTIKÖRPER GEGEN
BORDETELLA PERTUSSIS
BEI KINDERN UND ERWACHSENEN**

**NACHWEIS VON IgG-ANTIKÖRPERN
MIT HILFE EINES NEUENTWICKELTEN
ELISA-TESTVERFAHRENS**

CHRISTINE KÖNIG

München 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554635_0001

AUS DEM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS-BEAT HADORN

ANTIKÖRPER GEGEN BORDETELLA PERTUSSIS
BEI KINDERN UND ERWACHSENEN

NACHWEIS VON IGG-ANTIKÖRPERN MIT HILFE EINES
NEUENTWICKELTEN ELISA-TESTVERFAHRENS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

VORGELEGT VON
CHRISTINE KÖNIG
AUS
FREIBURG

JAHR
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. Peter Peller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Beat Hadorn

Dekan : Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.1986

Ich danke Herrn Prof. Peller für die
Oberlassung des Dissertationsthemas und
für seine allzeit bereitwillige Unter-
stützung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-
technischen Assistentinnen der Friedrich-
Baur-Stiftung der Universitätskinderkli-
nik München, die mir bei der Durchführung
des praktischen Teils behilflich waren.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. ZWECK UND ZIEL DER ARBEIT	8
III. METHODE	12
A. Serumproben	12
B. Methodik	13
a) Materialien	13
b) Versuchsanordnung	14
IV. ERGEBNISSE	18
V. DISKUSSION	25
VI. ZUSAMMENFASSUNG	39
VII. LITERATURVERZEICHNIS	41

Danksagung

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

=====

Pertussis ist eine akute Infektion des oberen Respirationstraktes, die besonders im Kindesalter gefährliche Komplikationen aufweisen kann. Der Erreger dieser höchst kontagiösen Erkrankung ist *Bordetella pertussis*, ein gramnegatives bekapseltes Bakterium. Es wurde 1906 von Bordet und Gengou erstmals beschrieben. Die Oberfläche der Mikroorganismen ist mit Fimbrien behaftet, diese Portefäden sind die Voraussetzung für die Adhäsion und Kolonisierung der Schleimhäute. Dadurch kommt es zu einer Hyperämie und Infiltration der Mukosa des gesamten Flimmerepithels der Luftwege mit Lymphozyten und polymorphkernigen Leukozyten bis hinab in die Bronchiolen (15, 23, 40).

Ein pertussisähnliches Krankheitsbild kann auch durch Viren hervorgerufen werden. Im Vordergrund stehen Adenoviren und RS-Viren, es konnten aber auch Viren der Herpesgruppe, Masern-, Mumps-, Influenza- oder Coxsackieviren bei Kindern, die eine typische Keuchhustensymptomatik zeigten, nachgewiesen werden. Sturdy und Court (38) erklären das überdurchschnittlich häufige Auftreten einer Virusinfektion im Zusammenhang mit Pertussis dadurch, daß keuchhusteninfizierte Kinder empfänglicher für eine sekundäre Virusinfektion sind oder daß Kinder

mit viralen Infekten im Hinblick auf eine Infektion mit *Bordetella pertussis* gefährdeter sind. Es besteht jedoch kein Zweifel darüber, daß *Bordetella pertussis* der Erreger des Keuchhustens ist (1, 4, 11, 12, 15, 21, 23, 30, 33, 38).

Die Ansteckung mit *Bordetella pertussis* erfolgt über eine Tröpfcheninfektion. Meist ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der höchsten Kontagiosität klinisch noch nicht manifest. Nach einer Inkubationszeit von 5 - 20 Tagen lassen sich in typischen Fällen drei Krankheitsstadien unterscheiden. Das katarrhalische Stadium dauert eine bis zwei Wochen und zeigt hauptsächlich die Symptome einer Entzündung des oberen Respirationstraktes. Das anschließende paroxysmale Stadium ist gekennzeichnet durch heftige Hustenanfälle mit Zyanose und Erbrechen. Die anfallsfreien Intervalle zeigen bei komplikationslosem Verlauf kaum eine Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes. Nach 2 - 4 Wochen folgt das Erholungsstadium, in dem die Hustenanfälle langsam abnehmen (4, 8, 9, 19, 23, 40).

Es kommt jedoch nicht immer zur Ausprägung dieses typischen Krankheitsbildes. Bei Erwachsenen sind abortive Krankheitsfälle sehr häufig, Säuglinge bieten dagegen oft das Bild schwerer, aber atypischer Infektionen (4, 31, 39).

Als häufigste Komplikation entwickelt sich aus der generalisierten Entzündung und Nekrose des Epithels eine Bronchopneumonie, in deren Verlauf Obstruktionen und Atelektasen sowie bleibende Bronchiektasien entstehen können (15). Die Pneumonie wird meist nicht durch *Bordetella pertussis* selbst hervorgerufen, sondern ist auf bakterielle Superinfektionen zurückzuführen (20, 23).

In Gehirn und Leber werden ebenfalls pathologische Veränderungen beobachtet. Zerebrale Hypoxie aufgrund der Asphyxie führt zu Krämpfen, Lähmungen und Koma. Bei dieser Pertussisenzephalopathie wird oft eine Leberverfettung beobachtet. Weiterhin kann es zu einer Aktivierung latenter Tuberkuloseherde kommen, auch treten Tetanien aufgrund der schweren Alkalose durch häufiges Erbrechen auf. Klinisch wichtig für die Diagnose ist die fast regelmäßig mit einer Keuchhustenerkrankung einhergehende Lymphozytose (4, 15, 20, 23). Vereinzelt können im Krankheitsverlauf auch leukämoide Reaktionen auftreten (8).

Die meisten Menschen bekommen Pertussis im Kindesalter, obwohl man in keinem Lebensalter vor einer Infektion geschützt ist. Im Gegensatz zu anderen sogenannten Kinderkrankheiten beobachtet man einen bevorzugten Befall des Säuglings- und Kleinkindesalters. Auf das erste Lebensjahr entfallen 2/3 aller Erkrankungen (6) und 40 % aller Todesfälle durch Keuchhusten ereignen sich bei

Kindern unter 5 Monaten (23). Aus diesem Grund wurde die These aufgestellt, daß von der Mutter auf das Kind weder diaplazentar noch über die Muttermilch Immunität gegenüber Pertussis übertragen wird (15, 23). Fast 90 % aller Pertussisfälle betreffen Kinder bis zum 7. Lebensjahr (6, 9), bei jüngeren Erwachsenen ist die Inzidenz der Erkrankung sehr gering, wie Untersuchungen bei Soldaten in beiden Weltkriegen gezeigt haben (23). Ältere Menschen können wiederum häufig abortive wie auch sehr ernsthafte Ausprägungen von Pertussis aufweisen (31).

Wie langfristige Untersuchungen in den USA, wo Pertussis meldepflichtig ist, gezeigt haben, hat sich in den letzten 20 Jahren ein Wandel in der Epidemiologie vollzogen. Die Inzidenz der Erkrankung sank um 50 %, dagegen verdoppelten sich die Krankheitsfälle der Säuglinge bis zum Alter von 3 Monaten auf 30 % aller Fälle (31).

In Deutschland ist man über die epidemiologische Situation noch vollkommen im Ungewissen. Zum einen gehört Pertussis hier nicht zu den meldepflichtigen Infektionskrankheiten, zum anderen fehlen bisher die Möglichkeiten, eine akute Erkrankung oder Immunität mit labor-technischen Mitteln nachzuweisen. Eine 1976 bis 1980 durchgeführte Erhebung bei praktische Kinderärzten in Deutschland erbrachte Angaben über insgesamt 11350 Pertussisfälle (32). Dabei wurde im Verlauf der Studie ei-

ne Zunahme der Erkrankungen um das 4,6fache beobachtet. Vergleichbare Daten desselben Zeitraumes aus den USA lassen eine wesentlich geringere Erhöhung der Pertussiserkrankungen erkennen (9). Man hat Grund zu der Befürchtung, daß in Deutschland, ähnlich wie in Großbritannien, eine langsam zunehmende Epidemie auftritt. Diese fände dann hauptsächlich ungeschützte Kinder vor, da die Impfimmunität von 80 % im Jahre 1974 auf mittlerweile 8 % abgesunken ist (5, 27, 32).

Eine 1978 erschienene Arbeit aus den USA vertritt die These, daß sich der Infektionsmodus geändert hat. Früher infizierten sich die Kinder gegenseitig, wodurch eine relativ breitgefächerte, natürliche und langanhaltende Immunitätslage erreicht wurde. Die in den 50er Jahren allgemein eingeführte DPT- (Diphtherie, Pertussis, Tetanus)-Impfung hinterließ zwar Immunität gegen Pertussis, diese nahm jedoch im Laufe des Lebens wieder ab. Das Hauptreservoir für Pertussiserkrankungen bei Kleinkindern hat sich somit zum Erwachsenenalter hin verschoben (31). Durch die meist schwach ausgebildeten Krankheitszeichen bei Erwachsenen wird die Ansteckungsgefahr für Kinder noch begünstigt. Auch wird angenommen, daß durch die Impfung zwar die Ausbildung eines klinischen Krankheitsbildes unterbunden wird, jedoch die Keimbeseidlung und das Bakterienwachstum nicht in jedem Fall gestört werden (5, 6, 20, 23, 25, 27).

Bisher sind in der Weltliteratur nur sehr vereinzelt immunologische Studien erwähnt. Ein Grund dafür ist wohl in der Tatsache zu suchen, daß die Diagnose "Pertussis" klinisch sehr schwer exakt zu stellen ist. Deshalb existieren nur ungenaue Vorstellungen über den wahren Durchseuchungsgrad der Bevölkerung. Die bisherigen serologischen Versuche, eine Keuchhustenerkrankung nachzuweisen, erstreckten sich einmal auf den direkten Bakteriennachweis und zum anderen auf verschiedene Verfahren zum Antikörpernachweis (1, 2, 4, 23, 39). Der direkte Nachweis bringt jedoch einige Probleme mit sich, da *Bordetella pertussis* ein anspruchsvolles Bakterium ist, welches nur auf Spezialnährmedien wächst, wofür nicht jedes Labor ausgerüstet ist. Die Rate der erfolgreichen Isolierung sinkt zudem mit Fortschreiten der Krankheit. Nach der 4. Woche ist das Bakterium praktisch nicht mehr nachzuweisen, selbst wenn die klinische Symptomatik unverändert anhält (23). Für den Antikörpernachweis wurden verschiedene Methoden angewandt wie Hämagglutinationstest, Komplementbindungsreaktion, Agglutinationstest und Immunfluoreszenz, jedoch waren die Ergebnisse meistens nicht zufriedenstellend (4, 17, 21, 26, 35, 39).

In Finnland führte man serologische Untersuchungen zum Nachweis von IgM, IgA und IgG-Antikörpern gegen Pertussis mit dem ELISA-Test durch. Die Ergebnisse waren im Vergleich mit der Bakterienagglutination sehr erfolg-

versprechend (26, 39). Der ELISA-Test war positiv in 75 % der Pertussiserkrankungen, bei denen eine Bakterienkultur gelang, wohingegen die Bakterienagglutination nur in 62 % positiv war. Die Immundiffusionsmethode zum Nachweis von präzipitierenden Antikörpern nach Ouchterlony zeigte sich der Bakterienagglutination bei Erkrankung ebenfalls überlegen. Allerdings beansprucht dieser Test bis zu 10 Tagen und zeigte bei gesunden Erwachsenen nur in 27,6 % positive Resultate, d.h. er ist für immunologische Studien ungeeignet (1).

In den 70er Jahren war die Komplementbindungsreaktion, die sich im Vergleich mit Bakterienagglutination als verlässlicher erwies, die am meisten angewandte Methode, um Erkrankungen des Respirationstraktes zu diagnostizieren. Aber selbst durch eine Kombination von Bakterienkultur und Serologie konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden (35).

In Indien wurden 1979 bei 48 % der Normalbevölkerung Pertussisantikörper mittels der Bakterienagglutination festgestellt (36).

In Schweden wurden Versuche gemacht, durch den ELISA-Test Antikörper gegen das fimbrienassoziierte Hämagglutinin nachzuweisen. Auch hier bewies der ELISA-Test seine hohe Sensivität und Spezifität, da durchgehend hohe IgG-Titer bei den meisten Erwachsenen gefunden wurden, wo andere serologische Tests versagt haben (3, 17).

II. ZWECK UND ZIEL DER ARBEIT

Um zu der Diagnose Pertussis zu gelangen, war man bisher auf Symptomatik und Verlauf der Erkrankung angewiesen (4, 20, 23). Ein für die Routinediagnostik geeigneter und zuverlässiger Test stand bisher noch nicht zur Verfügung. Dadurch erkannte man die Erkrankung meist erst im paroxysmalen Stadium, zu einem Zeitpunkt, an dem die Infektiosität schon größtenteils vorüber war. Die Möglichkeit eines zuverlässigen Schutzes gegenüber ungeimpften und gefährdeten Kindern war somit relativ gering. Aufgrund der häufigen atypischen oder abortiven Formen wurde die Krankheit oft nicht entdeckt.

Wie man aus der Literatur entnehmen kann, zeigen die klassischen Techniken zur Antikörperbestimmung wie Bakterienagglutination oder Komplementbindungsreaktionen nur zum Teil positive Ergebnisse, auch ist eine schnelle Diagnosestellung nicht möglich, da zur Beurteilung eines Antikörperanstiegs zwei zeitlich auseinanderliegende Serumproben benötigt werden (39). Besonders bei Säuglingen wird zudem eine sehr schwache Antikörperbildung beobachtet (35, 39). Die Pertussis-ähnlichen Syndrome, die durch Viren hervorgerufen werden, konnten bisher gegenüber einer Infektion mit *Bordetella pertussis* nicht routinemäßig abgegrenzt werden, wodurch Diagnostik und

Therapie in hohem Maße erschwert wurden (22, 23).

Es stellt sich also die Forderung nach einer allgemein verfügbaren und zuverlässigen Methode, um die IgM- und IgG-Antikörperbildung nach Infektion oder Impfung genau beurteilen zu können. Wie schon Untersuchungen in Finnland 1982 gezeigt haben, erfüllt der ELISA-Test die oben genannten Voraussetzungen (39): Schon nach kurzer Zeit liegt das Ergebnis vor, wobei der ELISA-Test zehnbis hundertmal empfindlicher ist als andere Methoden. Darüber hinaus erlaubt er eine nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Trennung von Antikörpern der verschiedenen Klassen. Dabei genügt eine einzige Serumprobe, um durch Nachweis spezifischer IgM-Antikörper eine verlässliche Aussage machen zu können.

Bisher bestehen noch keine genauen Vorstellungen darüber, welche Komponente oder Komponenten des Bakteriums die Immunität nach einer Erkrankung auslösen (23). Aus diesem Grund war es noch nicht möglich gewesen, einen selektiven Impfstoff herzustellen, der einen entsprechenden Grad an Immunität vermittelte wie eine durchgemachte Erkrankung. Die herkömmlichen Pertussisimpfstoffe zur aktiven Immunisierung gegen Keuchhusten enthalten meist abgetötete Keime der *Bordetella pertussis*. Nach der Impfung beobachtet man häufig lokal an der Impfstelle Schmerzen und Entzündungen, aber auch Fieber und in

seltenen Fällen neurologische Komplikationen bis hin zur Enzephalitits (5, 6, 18, 25, 27).

In jüngster Zeit wurde von den Behring-Werken ein neuartiges Antigen aus extrahierten Bakterienmembranen entwickelt. Man nimmt an, daß diese Komponente das schützende Antigen des Bakteriums darstellt (18).

Ziel dieser Studie ist es, die Durchseuchung im Hinblick auf Pertussis in der Normalbevölkerung nachzuweisen. Dabei könnte es sich sowohl um mütterlicherseits übertragene Antikörper handeln als auch um Immunität nach Infektion oder Impfung. In diesem Fall beschränken wir uns auf den Nachweis der IgG-Antikörper, da diese Gruppe im Gegensatz zu den IgA- und IgM-Antikörpern mit einer gewissen Latenzzeit nach der Infektion auftritt dann für einige Zeit persistiert (39).

Mit dieser Methode sollte dann eine Beantwortung der Frage, wie groß die Durchseuchung der Normalbevölkerung mit Pertussis-IgG-Antikörpern ist, möglich sein. Hierfür ist die prozentuale Beteiligung der verschiedenen Altersgruppen von großer Bedeutung, d. h. das Verhalten des Antikörperspiegels mit zunehmendem Alter. Ob und in welchem Ausmaß schützende Antikörper beim Neugeborenen vorhanden sind, ist dabei besonders wichtig.

Darüber hinaus bietet der ELISA-Test die Möglichkeit, eine relativ genaue Aussage über den quantitativen Antikörpergehalt bei den verschiedenen Altersstufen zu machen. Berücksichtigt man dazu die Impfanamnese der Probanden, wird man die Immunitätslage nach Impfung feststellen können. Für die Klinik würde das bedeuten, daß man sich vor der bislang nicht in allen Fällen risikolosen Impfung ein Bild von der Immunitätslage machen könnte und anschließend eine Kontrolle des Impferfolges in der Hand hat.

III. METHODE

A. Serumproben

Es wurden insgesamt 606 Seren von Probanden unterschiedlichen Alters auf Pertussis IgG-Antikörper mittels ELISA-Test untersucht. Die Serumproben stammen aus dem Krankengut oder von Blutspendern des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Universität München aus den Jahren 1980 bis 1983. Bei der Auswahl der zu testenden Seren wurde darauf geachtet, daß kein Verdacht auf eine akute Keuchhustenerkrankung vorlag. Darüber hinaus wurden auch solche Probanden ausgeschlossen, die Infektionen des oberen Respirationstraktes aufwiesen, um abortive oder untypische Pertussiserkrankungen auszuschließen.

Die Testseren wurden aufgeteilt in 6 Gruppen (siehe Tabelle 1).

Tab. 1: Aufschlüsselung der Probanden nach Alter und Geschlecht

Gruppe	A l t e r	n o	n ♀	n Gesamt
A	0 - 6 Mon.	42	31	73
B	7 - 12 Mon.	14	8	22
C	1 - 5 Jahre	69	43	112
D	6 - 10 Jahre	74	56	130
E	11 - 18 Jahre	78	53	131
F	> 18 Jahre	33	105	138
				606

B. Methodik

a) Materialien

1. Enzymkonjugate AP der Firma Behring, hergestellt durch Kopplung von alkalischer Phosphatase (AP) mit anti-human-Globulin der IgG-Klasse.
2. Zusatzreagenzien für Enzygnost der Firma Behring:
 - Substrattabletten aus p-Nitrophenylphosphat;
 - Substratpuffer; pH 6,8, der 100 ml Diäthanolamin und Magnesiumchlorid enthält.
 - Verdünnungspuffer AP aus sterilem Phosphatpuffer, pH 7,0, mit Tween-20-Natriumazid und Proteinzusatz.
 - Waschlösung AP (Konzentrat) aus sterilem, 20-fach konzentriertem Phosphatpuffer versetzt mit Tween-20.
3. Phosphatpuffer pH 7,4.
4. Pertussisextrakt-Antigen der Fa. Behring.
5. Tussoglobulin der Fa. Behring (Pertussis-Immunglobulin).
6. Mikro-Titerplatten aus Polystyrol; aufgeteilt in jeweils acht Streifen.

Alle Reagenzien, wie Verdünnungspuffer AP, gebrauchts-
verdünntes Enzymkonjugat AP und die Substratlösung, müs-
sen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht wer-
den (20°C).

Die Seren waren bei minus 20°C tiefgefroren gelagert, sie wurden ebenfalls vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht.

b) Versuchsanordnung

1. Kodierung der Mikro-Titerplatten:

Pertussisextrakt-Antigen wird mit Phosphatpuffer pH 7,4 im Verhältnis 1 : 400 verdünnt. In jede Vertiefung der mit Polystyrol beschichteten Mikro-Titerplatten gibt man 20 µl des verdünnten Antigens und inkubiert die Platten im Brutschrank bei 37°C über 24 Stunden lang. Bei diesem Vorgang verbindet sich das Antigen mit der Polystyrolschicht und bildet einen unlöslichen Komplex. Anschließend wird mit je 200 µl 90%igem unvergälltem Alkohol 10 Minuten fixiert. Die so vorbereiteten Mikro-Titerplatten können nun entweder sofort verwendet oder über mehrere Wochen bei minus 20°C tiefgefroren aufbewahrt werden. Unmittelbar vor dem Gebrauch müssen sie achtmal mit der Waschlösung gewaschen werden.

2. ELISA-Test:

Die aufgetauten Serumproben werden mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1 : 50 verdünnt. In jede Vertiefung der antigenbeschichteten Mikro-Titerplatten werden mit einer Eppendorf-Pipette 200 µl der Serumverdünnung gege-

ben. Anschließend inkubiert man die Platten für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Um Verdunstung zu vermeiden, müssen die Platten luftdicht abgeklebt werden. Sind im Serum spezifische, gegen das Pertussisextrakt-Antigen gerichtete IgG-Antikörper vorhanden, verbinden sich diese während der Inkubation mit den an die Polystyrolschicht gebundenen Antigenen. Nach der Inkubation werden die Platten achtmal mit Waschlösung gewaschen. Danach gibt man in jede Vertiefung 100 µl AP-Konjugat IgG Behring, welches mit Verdünnungspuffer AP im Verhältnis 1 : 60 verdünnt wurde. Während der folgenden einstündigen Inkubation verbindet sich das mit der alkalischen Phosphatase gekoppelte Anti-IgG-Humanglobulin mit dem Antigen-Antikörper-Polystyrol-Komplex. Danach erfolgt nach nochmaligem Waschen die Substratzugabe. Für die Substratlösung löst man in 45 Minuten eine Substrattablette in 5 ml Substratpuffer unter Lichtabschluß auf. In jede Vertiefung werden 100 µl der Substratlösung gegeben; diese läßt man ebenfalls unter Lichtabschluß einwirken. Der Enzymanteil des gebundenen Konjugats geht mit dem Substrat eine Reaktion ein: diese Reaktion wird durch einen Farbumschlag nach gelb hin optisch erkennbar. Nach 30 Minuten wird der Prozess mit 50 µl 2n NaOH gestoppt.

Der entstandene Farbkomplex wird mit dem Photometer mit Filter 405 gemessen.

Versuchsanordnung:

Jeder Streifen einer Mikro-Titerplatte enthält 12 Vertiefungen. Die Proben wurden jeweils nach folgendem Schema pipettiert:

1. Negativkontrolle
2. Positivkontrolle
3. Verdünnungspuffer
4. bis 11. Serumproben
12. Tussoglobulin in der Verdünnung 1 : 51200.

Das negative Kontrollserum wurde empirisch in mehreren Testreihen aufgrund der im Vergleich zu anderen Seren konstant niedrigen Extinktion ermittelt. Auch war anamnestisch keine DPT-Impfung, akute Pertussiserkrankung oder eine andere Infektion der oberen Luftwege festzustellen. Das negative Kontrollserum wurde für alle 606 Serumproben beibehalten. Von der im Photometer gemessenen Extinktion der einzelnen Proben wurde die Extinktion der negativen Kontrolle subtrahiert. Als Grenzwert zwischen positivem und negativem Ergebnis wurde die relative Extinktion $E = 0,2$ angesetzt.

Die positiven Kontrollen bestanden aus Tussoglobulin mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1 : 50 verdünnt. In diesem Fall ergab die photometrische Messung durchgehend Werte größer 2,0, was der hohen Antikörperkonzentration

erwartungsgemäß entsprach.

Ebenfalls zur Kontrolle über die Meßgenauigkeit dienten die in jeder Reihe mitlaufenden Pufferlösungen und die Tussoglobolverdünnungen 1 : 51200.

Aufgrund der direkt proportionalen Beziehung zwischen Extinktion und IgG-Konzentration des Serums ermöglicht der ELISA-Test nicht nur eine Differenzierung zwischen negativem und positivem Ergebnis, sondern er macht auch eine Aussage über die Höhe des Antikörper-Titers.

Zur Beurteilung des durchschnittlichen Antikörper-Titers in den einzelnen Altersgruppen wurde der Mittelwert der positiven Extinktionen errechnet. Zur Verdeutlichung wurde der Faktor $F = \frac{\Delta (S-N)}{0,2}$ für jedes positive Serum bestimmt (S = Extinktion des Testserums, N = Extinktion des Negativserums; 0,2 = Grenzwert zwischen positivem und negativem Ergebnis).

IV. ERGEBNISSE

Gruppe A:

Im Alter von 0 - 6 Monaten wiesen 37 der insgesamt 73 untersuchten Seren IgG-Antikörper gegen Pertussis auf, was einer Durchseuchung von 51 % entspricht. Von den männlichen Probanden reagierten 50 % positiv, von den weiblichen 55 % (Tab. 2, 3). Der Mittelwert der relativen positiven Extinktionen betrug in dieser Gruppe

$\Delta E = 0,437$, daraus läßt sich der Faktor 2,2 errechnen.

Gruppe B:

Den niedrigsten prozentualen Anteil an Pertussis-Antikörpern hatte die Gruppe der 7 - 12 Monate alten Kinder. Von 22 getesteten Seren reagierten 7 positiv für IgG-Antikörper, das entspricht 32 %. 21 % der männlichen Probanden und 50 % der weiblichen Probanden waren positiv (Tab. 2, 3). Allerdings wurden hier die höchsten positiven Extinktionen gemessen, der Mittelwert von E betrug 0,578; was einem Faktor von 2,8 gleichkommt.

Gruppe C:

In der Gruppe der 1 - 5 Jährigen blieb die Zahl der Antikörper enthaltenden Seren mit 33 % ungefähr auf dem Niveau der vorangehenden Gruppe. Von insgesamt 112 Probanden reagierten 37 positiv, wobei sowohl die männli-

lichen als auch die weiblichen Probanden zu 33 % positiv waren (Tab. 2, 3). Der durchschnittliche Antikörper-Titer sank auf einen Extinktionswert von 0,488, entsprechend einem Faktor von 2,4.

Gruppe D:

In der Altersgruppe der 5 - 10 Jährigen wurden insgesamt 130 Seren untersucht, wobei 55 positiv reagierten; das entspricht einer im Vergleich zur vorangehenden Gruppe wieder angestiegenen Durchseuchung auf 42 %. Hierbei waren die Seren männlicher Probanden mit 43 %, die weiblicher Probanden mit 36 % vertreten (Tab. 2, 3). Die Antikörperspiegel sanken auf den entsprechenden Extinktionsbetrag von 0,394, was einem Faktor von 2,0 gleichkommt.

Gruppe E:

Die 10 - 18 Jährigen wiesen eine Durchseuchung von 59 % auf, 63 % der männlichen und 53 % der weiblichen Probanden reagierten positiv. Der Antikörperspiegel blieb dagegen auf derselben Höhe wie in der Altersgruppe der 5 - 10 Jährigen. Der Mittelwert der positiven Extinktionsdifferenzen betrug 0,398, der Faktor lautete wiederum 2,0. Insgesamt wurden 131 Seren getestet (Tab. 2, 3).

Gruppe F:

Von den Probanden, die älter als 18 Jahre waren, wiesen 65 % Antikörper auf, d.h. 90 von 138 Seren reagierten positiv. Darunter waren 64 % der männlichen und 66 % der weiblichen Probanden (Tab. 2, 3). Der Antikörper-Titer entsprach einer Extinktionsdifferenz von 0,348, was einem Faktor von 1,7 gleichkommt.

Tab. 2: Antikörper gegen Bordetella pertussis in der Normalbevölkerung. Prozentuale Verteilung und Höhe des Antikörper-Titers.

Gruppe	A l t e r	n Gesamt	n pos	% pos	$\bar{x}\Delta(S-N)^{*1}$	$\bar{x}_{\text{Faktor}}^{*2}$
A	0 - 6 Mon.	73	37	51	0,437	2,2
B	7 - 12 Mon.	22	7	32	0,578	2,8
C	1 - 5 Jahre	112	37	33	0,488	2,4
D	6 - 10 Jahre	133	55	42	0,394	2,0
E	11 - 18 Jahre	131	77	59	0,398	2,0
F	> 18 Jahre	138	90	65	0,348	1,7

*1 $\Delta(S-N)$: Differenz zwischen Extinktion der Serumprobe und Negativprobe.

*2 Faktor : $\frac{\Delta(S-N)}{0,2}$

Seren

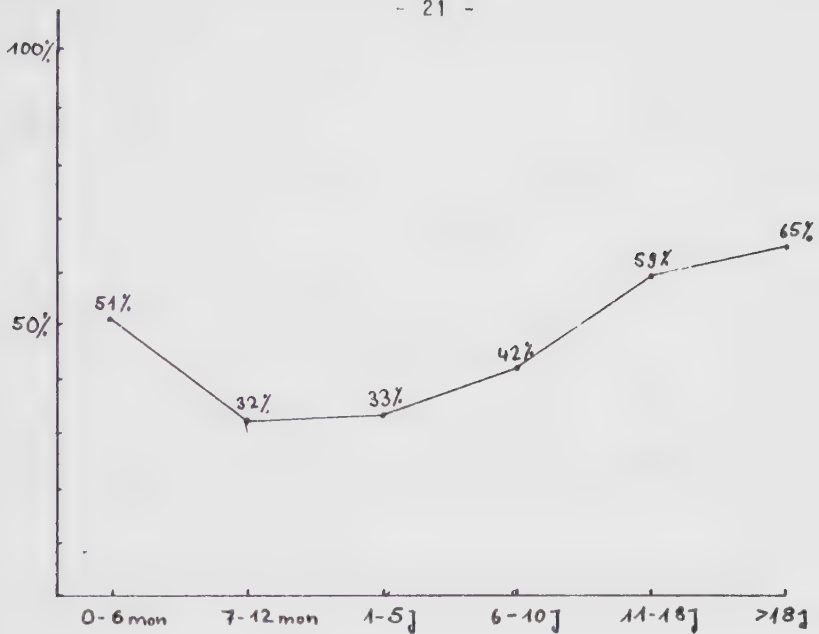


Abb. 1: Prozentuale Verteilung antikörperpositiver Probanden mit steigendem Alter

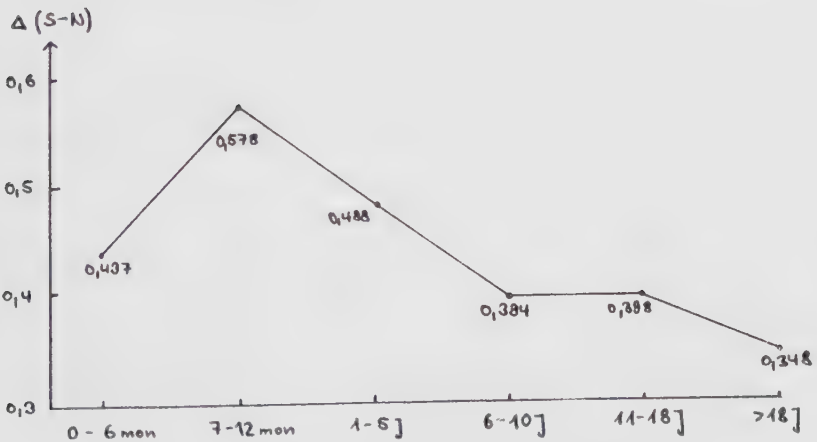


Abb. 2: Verlauf der Höhe des Antikörper-Titers mit steigendem Alter

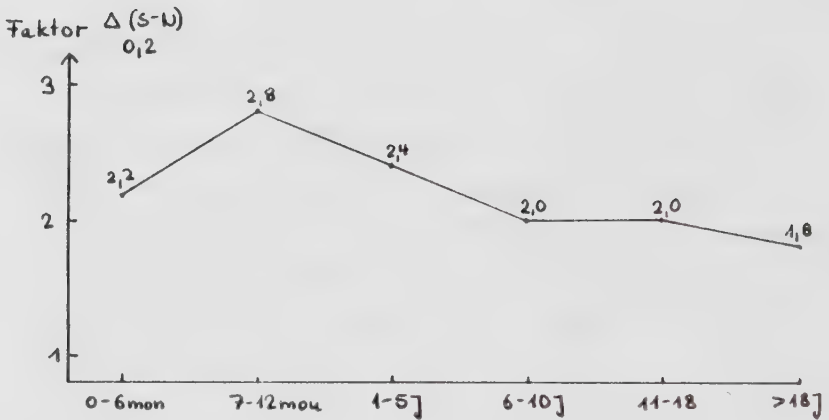


Abb. 3: Verlauf des Faktors $\frac{\Delta(S-N)}{0,2}$ (S = Serumprobe; N = Negativprobe) als Maß für den Antikörpertiter mit steigendem Alter

Tab. 3: Aufschlüsselung der antikörperenthaltenden Seren nach männlichen und weiblichen Probanden

Gruppe	männlich			weiblich		
	n	n +	% +	n	n +	% +
0 - 6 Mon.	42	21	50 %	31	17	55 %
7 - 12 Mon.	14	3	21 %	8	4	50 %
1 - 5 Jahre	69	23	33 %	43	14	33 %
6 - 10 Jahre	74	32	43 %	56	20	36 %
11 - 18 Jahre	78	49	63 %	53	28	53 %
> 18 Jahre	33	21	64 %	105	69	66 %

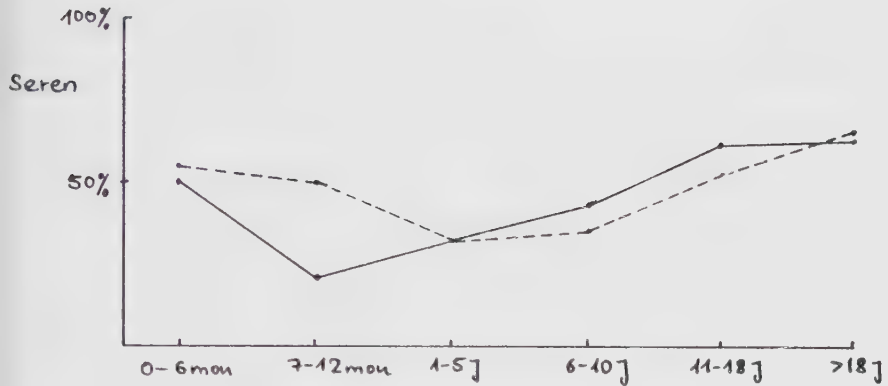


Abb. 4: Verlauf der antikörperenthaltenden Seren nach Aufschlüsselung in männliche (—) und weibliche (---) Probanden

Tab. 4: Höhe des IgG-Antikörperspiegels bei geimpften Kindern im Alter von 1 - 5 Jahren

Patient	Alter (Jahre)	Anzahl der Pert.- Impfungen	Faktor
1	3	4	2,2
2	3	?	5,9
3	5	1	5,4
4	2	1	1,8
5	1	1	2,1
6	2	3	1,3
7	3	3	1,4

$$\overline{\text{Fkt}}_{(7)} = 2,9$$

Tab. 5: Höhe des IgG-Antikörperspiegels bei positiv reagierenden, nicht geimpften Kindern im Alter von 1 - 5 Jahren

Patient	Alter (Jahre)	Faktor
1	4	2,7
2	4	1,2
3	5	2,0
4	3	1,6
5	4	1,5

$$\overline{\text{Fkt}}_{(5)} = 2,0$$

V. DISKUSSION

=====

Über die beste Methode zur exakten Diagnose von Keuchhustenerkrankungen gibt es kontroverse Auffassungen. Einige Autoren halten die Komplementfixation (31), andere den direkten Bakteriennachweis (23) für die zuverlässigere Technik. Alle sind sich jedoch darüber im klaren, daß keine der bisher angewandten Methoden wirklich zufriedenstellend ist (23, 31, 4, 25).

Der direkte Bakteriennachweis bietet aufgrund der schon erwähnten komplizierten Kulturbedingungen große Schwierigkeiten, wodurch bei einer signifikant hohen Anzahl von Patienten mit klinischem Keuchhusten die Kultur für *Bordetella pertussis* nicht gelingt. Weitere Erklärungsmöglichkeiten dafür sind vorherige antibiotische Therapie, durch Impfung induzierte Teilimmunität oder zu späte Durchführung des Abstrichs (4).

Der direkte Antikörpernachweis durch Immunfluoreszenz erwies sich als unspezifisch und ergab bis zu 40 % falsch positive Ergebnisse (26).

Die bisher angewandten serologischen Methoden waren nicht allein zur Einschätzung des Immunstatus, sondern auch bei akuten Erkrankungen, selbst in Kombination mit der Bakterienkultur, nur begrenzt erfolgreich (35).

Durch die Einführung des ELISA-Testverfahrens, schon 1971 beschrieben von Engwall und Perlmann (13), zur Bestimmung und Quantifizierung von Antikörpern, eröffneten sich der medizinischen Mikrobiologie neue Möglichkeiten. Nach Bindung des Antigens an eine feste Phase wird die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper indirekt mit einem Anti-IgG-Enzym-Konjugat gemessen. Bisher konnten eine große Anzahl von Immunglobulinklassen mit annähernd gleich guten Ergebnissen quantitativ und qualitativ bestimmt werden (7).

Der limitierende Faktor in der Sensitivität dieses Tests ist, exakte Durchführung vorausgesetzt, einzig die Affinität des Antikörpers zu dem Antigen. Wird durch das Verfahren das Protein in seinem Aufbau verändert oder das Antigen durch die Bindung an die Polystyrolschicht in seiner molekularen Struktur umgewandelt, dürfte die Sensitivität des Testes beträchtlich sinken (34).

1981 erbrachten Granström u. Mitarbeiter (17) in Finnland gute Ergebnisse mit dem ELISA-Test, indem sie Antikörper gegen das fimbrienassoziierte Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* nachwiesen. Bei akuten Keuchhustenerkrankungen, die entweder aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes oder durch die Bakterienkultur bewiesen waren, konnte ein signifikanter Anstieg in allen drei Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA aufgezeigt

werden. Allerdings besteht Anlaß zu der Vermutung, daß der ELISA-Test nicht nur auf Infektionen mit *Bordetella pertussis* hinweist, denn er fiel bei durch Kultur nachgewiesenen Infektionen mit *Bordetella parapertussis* ebenfalls positiv aus. Inwieweit dies von dem verwendeten Antigen abhängig war, oder ob die Antikörperproduktion bei Infektionen mit *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis* identisch ist, läßt sich zum Zeitpunkt noch nicht sagen. Entsprechende Untersuchungen mit dem von uns verwendeten Antigen aus extrahierten Bakterienmembranen liegen bisher nicht vor.

Ein Vergleich der Komplementfixation mit dem ELISA-Test ergab eine relativ gute Korrelation bei Kindern zwischen 1 und 12 Jahren, dabei erwies sich jedoch der ELISA-Test als die sensitivere Methode. Bei Kleinkindern unter einem Jahr und bei Kindern und Erwachsenen über 12 Jahren waren die Titer bei der Komplementfixation jedoch niedrig oder negativ, wohingegen der ELISA-Test eindeutig positiv ausfiel. Eine Erklärung dieser Diskrepanz existiert bis heute nicht. Die niedrigere Sensitivität des Komplementbindungstests kann nicht allein die Ursache sein, da Erwachsene mit einem negativen Komplementbindungstest genauso hohe oder höhere Titer im ELISA-Test aufwiesen wie die Kinder, bei denen beide Tests positiv ausfielen (17).

Im Vergleich mit der Bakterienkultur lieferten serologische Methoden wie Komplementfixation oder Bakterienagglutination bei Kindern unter 6 Monaten schlechte Ergebnisse (17, 35, 39). Auch andere Infektionen des Respirationstraktes lassen bei Säuglingen und kleinen Kindern eine schwache oder verzögerte Antikörperbildung erkennen. Bei Kindern unter einem Jahr konnten Barraff u. Mitarbeiter 1978 (4) in 83 % eine Infektion mit *Bordetella pertussis* durch die Kultur nachweisen, während bei älteren Patienten nur noch in 53 % der Fälle kulturell ein Nachweis möglich war. Bei älteren Kindern oder Erwachsenen war der Antikörpernachweis durch serologische Methoden wiederum erfolgreicher.

Auch Granström und Mitarbeiter (17) berichten von zwei neugeborenen Kindern, bei denen die Kultur für *Bordetella pertussis* positiv war, wohingegen die Serologie im ELISA-Test negativ ausfiel.

Viljanen und Mitarbeiter (39), die zur Pertussisdiagnose den ELISA-Test anwendeten, erhielten bei Kindern unter 3 Monaten nur in 20 % positive Resultate, wohingegen die Bakterienisolation wesentlich höhere Erfolgsraten lieferte. Allerdings stieg die Korrelation zwischen ELISA-Test und Bakterienisolation von 25 % auf 86 %, wenn zur Beurteilung des Ergebnisses im ELISA-Test zwei in unterschiedlichen Krankheitsphasen entnommene Serum-

proben untersucht wurden. In dieser Altersgruppe sollte man sich deshalb bei Verdacht auf Pertussiserkrankung nicht nur auf die Ergebnisse des ELISA-Tests verlassen, sondern zur Sicherheit einen Nasen-Rachen-Abstrich für den direkten Bakteriennachweis anfertigen lassen.

In bezug auf die Frage der Durchseuchung mit Pertussis-antikörpern in der Normalbevölkerung fanden wir in der Gruppe der Säuglinge im Alter von 0 - 6 Monaten in 51 % positive Resultate (Tab. 2). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der bisher von den meisten Autoren vertretenen Meinung, daß Neugeborene keine von der Mutter übertragene Antikörper gegen Pertussis haben (15, 16, 23, 31). Nelson (31) führt dies in seiner Studie über die Epidemiologie von Pertussis darauf zurück, daß Frauen im gebärfähigen Alter normalerweise sehr niedrige oder unmeßbare Antikörper-Titer besitzen. Obwohl IgG-Antikörper plazentagängig sind, könnte das Neugeborene eine auf diesen Antikörpern basierende Immunität von der Mutter nicht erhalten haben, es sei denn, sie wäre kurz vor der Geburt gegen Keuchhusten geimpft worden (16). Aus unseren Ergebnissen geht jedoch hervor, daß 66 % aller Frauen über 18 Jahren IgG-Antikörper gegen Pertussis aufweisen (Tab. 3). Demzufolge liegt die Vermutung nahe, daß diese mütterlichen Antikörper auf das Kind übertragen werden, wodurch der hohe prozentuale Anteil von 51 % Pertussis-Antikörper-positiver Neugeborener zu erklären

wäre. Für die Richtigkeit dieser These spricht auch die Beobachtung, daß die Höhe der Antikörper-Titer bei den über 18 Jährigen nicht wesentlich von dem der Neugeborenen abweicht (Abb. 2).

Allerdings stellt sich die Frage, ob ein Antikörperspiegel dieser Höhe wirklich ausreichend Schutz vor einer Infektion bietet. Ein großer Anteil der Pertussisfälle tritt im ersten Lebensjahr auf (6). Da vermutlich der Antikörpertiter zu niedrig ist, um eine Infektion zu vermeiden, und gleichzeitig das eine Schutzfunktion ausübende sekretorische IgA noch nicht ausreichend produziert wird, kommt es aufgrund der in diesem Alter noch schwach ausgebildeten Abwehrlage häufig zu schweren Komplikationen, die sich in höherem Alter nicht mehr in dem Ausmaß zeigen.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden Granström und Mitarbeiter (17) bei ihren epidemiologischen Untersuchungen mit dem ELISA-Test bei 50 % der Neugeborenen IgG-Antikörper. Feigin berichtet in seinem Artikel "Pertussis", daß zwar nennenswerte Konzentrationen von Pertussis-Agglutininen bei einem Drittel aller Neugeborenen im Serum nachgewiesen werden konnten, dies stünde jedoch in keinem Zusammenhang mit einer Immunität (15).

Eine Infektion mit *Bordetella Pertussis* in utero ist dagegen als unwahrscheinlich anzusehen (31). Es finden sich zwar in der Literatur Hinweise auf konnatalen

Keuchhusten, Nelson gesteht diesen Angaben jedoch keine wissenschaftliche Bedeutung zu und hält sie für "persönliche Anekdoten". So berichtet z.B. Mittelstaedt in seinem Artikel "Über angeborenen Keuchhusten" aus dem Jahre 1939 (29) von einem Kind, welches sofort nach der Geburt durch keuchhustenähnliche Anfälle auffiel. Ähnliche Beschreibungen werden auch von Lapin (1943) (24) und Cockayne (1913) (10) gegeben. In der neueren Literatur finden sich jedoch keine derartigen Fälle mehr, so daß man wohl davon ausgehen kann, daß es sich damals um Fehldiagnosen handelte. Die Möglichkeit einer plazentaren Infektion ist auch aus dem Grunde auszuschließen, weil *Bordetella pertussis* sich nur in der Schleimhaut ansiedelt und vermehrt, dagegen nicht in die Blutbahn übergeht (2, 20, 40). Andererseits ist jedoch nicht auszuschließen, daß von einer erkrankten Schwangeren die bei einer Pertussis-Infektion freigesetzten Toxine in das kindliche Blut übergehen und so eventuell das Bild eines konnatalen Keuchhustens auftreten könnte.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, steigt der Anteil der Normalbevölkerung, der Antikörper gegen Pertussis aufweist, vom ersten Lebensjahr kontinuierlich an. In der Gruppe der 1 - 5 Jährigen finden sich prozentual nur halb so viele IgG-Antikörper-positive Probanden wie in der Gruppe der über 18 Jährigen (Tab. 2). Demnach infizieren sich sehr viele Menschen erst im Laufe ihres Lebens mit *Bordetella per-*

tussis, ohne daß es zu dem bei Säuglingen und Kleinkindern oft so typischen Krankheitsablauf kommt. Zwar werden auch bei Erwachsenen sehr schwere Erkrankungsformen beobachtet (23, 31), diese sind jedoch äußerst selten. Meist verlaufen die Erkrankungen abortiv und werden, wenn überhaupt, oft nur durch Zufall diagnostiziert (6, 31).

Die durch Krankheit erlangte Immunität im Kindesalter hält nur für eine begrenzte Zeit an (23). Fanconi beobachtete Neuerkrankungen nach durchgemachter Infektion (14). Ebenso wird von Patienten berichtet, die nach dreimaliger DPT-Impfung und wiederholten Auffrischimpfungen an Pertussis erkrankten (31).

Unsere Beobachtungen über die steigende Immunität mit zunehmendem Alter (Abb. 1) bekräftigen die These von häufigen Infektionen älterer Kinder und Erwachsener aufgrund der mit steigendem Alter sinkenden Immunität.

Die Höhe des Antikörpertiters in Abhängigkeit vom Alter (Abb. 2 und 3) läßt ein deutliches Absinken erkennen. Diese Tatsache beweist, von einigen Ausnahmen abgesehen, daß die Infektionen mit zunehmendem Alter nicht mehr die Ausmaße erreichen wie sie im Kindesalter zu beobachten sind und dementsprechend keine allzu hohen Antikörpertiter hervorrufen.

Eine Untersuchung über das Verhalten der IgA- und IgM-

Antikörperproduktion, die bei akuten Erkrankungen eine genauere Aussage machen als der IgG-Antikörperspiegel, könnte hierbei sehr aufschlußreich sein.

Die Zunahme der IgG-Antikörper-positiven Probanden mit steigendem Alter bekräftigt die These, die Nelson (31) in seinem Artikel über den Wandel in der Epidemiologie von Pertussis-Erkrankungen aufstellt. Wie schon in der Einleitung angedeutet, hat die in den 50er Jahren allgemein durchgeführte DPT-Impfung bei Kleinkindern einen Immunstatus geschaffen, der dem einer durchgemachten Infektion unterlegen war. Da damals noch sehr wenig über *Bordetella pertussis* bekannt war und keine genauen Vorstellungen über den die Immunität verursachenden Faktor bestanden, war der Impfstoff qualitativ minderwertig. Daraus resultierte eine Zunahme der Keuchhustenerkrankungen bei älteren Kindern und Erwachsenen, die Kontakt mit erkrankten Personen hatten. Durch die in den meisten Fällen schwach ausgebildeten Krankheitszeichen wurde selten die zutreffende Diagnose gestellt, und so entwickelten sich diese Patienten zum Hauptreservoir der Ansteckungsquellen für Kleinkinder, die entweder nicht immunisiert waren oder durch eine Impfung keinen ausreichenden Schutz erhalten hatten. Vor der Einführung der Impfung war der Immunitätsstatus unter Kindern aufgrund der durchgemachten Infektionen wesentlich höher gewesen, sie hatten sich gegenseitig infiziert und waren zum größ-

ten Teil immun gegen eine erneute Ansteckung gewesen.

Man kann davon ausgehen, daß wir mit dem ELISA-Test nur Pertussis-spezifische Antikörper nachgewiesen haben. Schon 1941 beobachteten Mishulow und Mitarbeiter (28), daß schützende Antikörper gegen Pertussis nicht durch andere Infektionskrankheiten der oberen Luftwege hervorgerufen werden. Zum Beweis dieser These verglichen sie die Seren gesunder Probanden mit Seren von an anderen respiratorischen Infekten Erkrankten und fanden keinen Unterschied bezüglich der Ausbildung von Pertussis-Antikörpern.

Im Gegensatz zu den meisten Infektionskrankheiten des Kindesalters zeigt Pertussis eine höhere Inzidenz bezüglich der Morbidität und Mortalität bei weiblichen Patienten verglichen mit männlichen (23,31). Unsere Ergebnisse lassen ebenfalls in den Altersgruppen bis zu einem Jahr eine größere prozentuale Beteiligung an antikörperpositiven Seren weiblicher Probanden erkennen, mit steigendem Alter sind jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Durchseuchung festzustellen (Tab.3, Abb.4).

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen, die Granström und Mitarbeiter 1982 (17) ebenfalls mit dem ELISA-Test erzielten, zeigt einen wesentlichen Unterschied auf. Die Höhe des Antikörpertiters bei älteren Kindern

und Erwachsenen war bei uns deutlich niedriger als bei Kindern bis zum Alter von einem Jahr, der Faktor $\frac{\Delta(S-N)}{0,2}$ sank mit zunehmendem Alter von einem Wert von 2,8 auf 1,8 (Tab. 2, Abb. 2 und 3). Demgegenüber fanden Granström und Mitarbeiter bei Erwachsenen einen höheren Antikörpertiter als bei Kindern. Dies wird durch die Theorie zu erklären versucht, daß wiederholte Reexpositionen zu *Bordetella pertussis* im Laufe des Lebens eine Zunahme der Antikörper bewirken könnten. Würde diese Theorie zutreffen, wären jedoch Erwachsene keine Hauptinfektionsquelle für Kinder mehr, da der hohe Antikörpertiter sie vor Infektion mit *Bordetella pertussis* schützen würde, zumal der von o.g. Autoren ermittelte Antikörpertiter bei Erwachsenen höher war als der bei Kindern nach einer Erkrankung. Unsere Resultate bestätigen dagegen die Auffassung, daß Kinder hauptsächlich durch Erwachsene infiziert werden.

Wodurch diese entgegengesetzten Ergebnisse hervorgerufen werden, ist nicht genau zu klären. Zum einen könnten sie darauf zurückzuführen sein, daß Granström und Mitarbeiter als Antigen das fimbrienassoziierte Hämagglutinin verwendeten. Das von den Behring-Werken hergestellte Antigen besteht dagegen aus extrahierten Bakterienmembranen. Zum andern könnten auch unterschiedliche Testbedingungen eine Rolle spielen, z.B. in der Serumverdünnung oder den Inkubationszeiten.

Relativ übereinstimmend verhielt sich jedoch der prozentuale Anteil der Seren, die Pertussis-IgG-Antikörper aufwiesen, sowie dessen Verhalten mit zunehmendem Alter der Probanden.

In der Altersgruppe der 7 - 12 Monate alten Kinder fand sich der geringste Anteil der Antikörper enthaltenden Seren, nur 32 % reagierten positiv im Vergleich zu 51 % in der vorangehenden Altersstufe (Abb. 1). Diese Beobachtung entspricht der Vermutung, daß zu diesem Zeitpunkt die von der Mutter übertragenen Antikörper größtenteils nicht mehr vorhanden sind. Allerdings waren hier die gemessenen Antikörpertiter am höchsten (Abb. 2). Ein eindeutiger Zusammenhang mit Impfanamnesen konnte nicht hergestellt werden, da die Angaben hierüber entweder sehr unzuverlässig oder die Kinder z.T. nur unvollständig immunisiert waren.

In dieser Altersgruppe stellte sich darüber hinaus das Problem, daß im Vergleich mit den anderen Altersgruppen nur sehr wenig Seren untersucht werden konnten. Es ist also fraglich, ob die Ergebnisse bezüglich dieser Altersstufe die tatsächliche Situation widerspiegeln (Tab. 1).

In der Altersgruppe der 1-5 Jährigen reagierten 37 von 112 Kindern positiv (33 %), dem durchschnittlichen Antikörpertiter entsprach ein Faktor von 2,4 (Abb. 1, 2, 3). Von 12 dieser Kinder konnte eine verlässliche Impfanamnese erhalten werden. 7 waren bis zum Alter von ei-

nem Jahr ein- bis dreimal DPT geimpft und wiesen einen durchschnittlichen Faktor von 2,9 auf. 5 der positiv reagierenden Kinder waren nicht geimpft, hierbei betrug der Faktor 2,0. Auch wenn es sich um eine relativ geringe Fallzahl handelt, läßt sich die deutliche Tendenz erkennen, daß geimpfte Kinder einen höheren Antikörperspiegel aufweisen als ungeimpfte Kinder (Tab. 4, 5). Mit zunehmendem Alter sinkt dieser Titer jedoch wieder, was der allgemeinen Auffassung entspricht, daß die Immunität ungenügend ist und nur für kurze Zeit anhält. Das kann eine Folge des bisher verwendeten Impfstoffes sein, der qualitativ minderwertig war.

Aufgrund der besonders bei neurologisch auffälligen Kindern aufgetretenen Impfkomplicationen wie Fieber, Krämpfen und Enzephalitis sowie der trotz ausreichender Immunisierung aufgetretenen Neuerkrankungen konnte ein deutlicher Rückgang der Pertussis-Impfungen verzeichnet werden (5, 6, 15, 23, 25, 27, 32, 37).

Durch eine langfristige Abnahme der Impfhäufigkeit könnte eine Änderung der Immunitätslage eintreten. Zum einen wäre ein Anstieg des Antikörperspiegels durch natürliche Infektionen oder Booster-Effekte nach wiederholten Expositionen denkbar, auf der anderen Seite wäre aufgrund mangelnder Impfungen ein Absinken des Antikörper-

titers möglich. Zur Überprüfung dieser Fragestellung würde sich die hier vorgestellte neue Methode zur Antikörperbestimmung sehr gut eignen.

Weitere diesbezügliche Untersuchungen sind angezeigt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Die Schwierigkeiten einer exakten Pertussis-Diagnostik haben es bisher nicht zugelassen, genaue Aussagen über Erkrankungsverlauf oder Impfindikationen zu machen. In jüngster Zeit wurde von den Behringwerken ein neuartiges Antigen aus extrahierten Bakterienmembranen entwickelt, mit dessen Hilfe die Bildung schützender Antikörper gegen Pertussis nachgewiesen werden kann.

Wir prüften in dieser Studie, inwieweit sich das Antigen zur Beurteilung des Immunstatus gegenüber Pertussis in der Normalbevölkerung heranziehen läßt. Als Untersuchungsmethode diente der ELISA-Test, ein enzymgekoppeltes Nachweisverfahren von Antikörpern im Serum. Da mit dem ELISA-Test eine sowohl quantitative wie qualitative Unterscheidung der verschiedenen Antikörperklassen möglich ist, konnten wir die Testseren spezifisch auf IgG-Antikörper gegen *Bordetella pertussis* untersuchen und darüber hinaus die Höhe des Antikörpertiters in den einzelnen Altersgruppen bestimmen.

Die Untersuchung der mehr als 600 getesteten Serumproben gesunder oder nicht an Infektionen des oberen Respirationstraktes erkrankter Probanden zeigte: Etwa die Hälfte aller Neugeborenen besitzen Antikörper der IgG-Klasse gegen Pertussis. Hierbei dürfte es sich um plazentar übertragene, mütterliche Antikörper handeln.

In der Altersgruppe bis zu einem Jahr war der Anteil der antikörperpositiven Seren auf 33 % abgesunken. Mit zunehmendem Alter stieg er wieder kontinuierlich bis auf 65 % in der Gruppe der über achtzehnjährigen Probanden an, wie es aufgrund der wiederholten Expositionen gegenüber Pertussis zu erwarten war.

Das Verhalten des Antikörpertiters spiegelt die epidemiologische Situation wider. Bei Kleinkindern zeigte sich ein der in diesem Alter häufigen Erkrankungswahrscheinlichkeit entsprechend höherer Antikörpergehalt als bei älteren Personen.

Unsere Beobachtungen geben Anlaß zu der Behauptung, daß es mit der Entwicklung dieses neuartigen Testverfahrens möglich geworden ist, die immunologische Situation bezüglich der Keuchhustenerkrankung zu beurteilen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

=====

- 1) Aftandelians, R.; Connor, J.D.: Immunologic studies of pertussis (Development of precipitins). J. Pediat. 83, 206-217 (1973)
- 2) Aftandelians, R.; Connor, J.D.: Bactericidal antibody in serum during infection with Bordetella pertussis. J. Infect. Dis. 128, 555-558 (1973)
- 3) Askelöf, P.; Granström, M.; Gillenius, P. and Lindberg, A.A.: Purifications and characterization of a fimbrial haemagglutinin from Bordetella pertussis for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. J. med. Microbiol. 15, 73 (1982)
- 4) Baraff, L.J.; Wilkins, J.; Wehrle, P.F.: The role of antibiotics, immunisations and adenoviruses in Pertussis. Pediatrics 61, 224-230 (1978)
- 5) Br. Med. J., Pertussis vaccine. 282, 1563-1564 (1981)
- 6) Broome, C.V.; Fraser, D.W.: From the centers for disease control. Pertussis in the United States, 1979: A Look at vaccine efficacy. J. Infect. Dis. 144, 187-280 (1981)
- 7) Carlsson, H.E.; Lindberg, A.A.: Applications of enzyme immunoassay for diagnosis of bacterial and mycotic infections. Scand. J. Immunol. 8, 97-110 (1978)

- 8) Catel, W.: Differentialdiagnose von Krankheitssymptomen bei Kindern und Jugendlichen. S. 770. Georg Thieme Verlag, 3. Auflage, Stuttgart 1961
- 9) Centers for Disease Control. Pertussis (whooping cough) - reported cases by state and age, United States, 1978. Morbidity Mortality Weekly Rep. 27: 48 (1979)
- 10) Cockayne, E.E.: Whooping cough in the first days of life. Br. J. Child Dis. 10, 534-537 (1913)
- 11) Connor, J.D.: Evidence for an etiologic role of adenoviral infection in pertussis syndrome. N. Engl. J. Med. 390-394 (1970)
- 12) Collier, A.M.; Connor, J.D. and Irving, W.R.: Generalized type 5 adenovirus infection associated with the pertussis syndrome. J. Pediatr. 69: 1073 (1966)
- 13) Engvall, E.; Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry, 8, 871 (1971)
- 14) Fanconi, G.; Wallgren, A.: Lehrbuch der Pädiatrie, 5. Auflage, S. 400-404, Verlag Benno Schwabe u. Co., Basel/Stuttgart 1958
- 15) Feigin, R.D.: Pertussis. Textbook of Pediatric Infections Diseases (1981)
- 16) Finland, M.: Pertussis: With notes on the maternal transmission of antibacterial antibodies, in Charles D.; Finland M. (eds.): Obstetric and

perinatal infections. Philadelphia, Lea & Febiger (1973)

- 17) Granström, M.; Lindberg, A.A.; Askelöf, P.; Hederstedt, B.: Detection of antibodies in human serum against the fimbrial haemagglutinin of *Bordetella Pertussis* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Microbiol.* 15, 85-96 (1982)
- 18) Helting, T.B.; Blackkolb, F.: Extracted protective antigen of *Bordetella pertussis*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 89, 93-101 (1981)
- 19) Henoch, E.: *Vorlesungen über Kinderkrankheiten*. 2. Aufl., 390, Berlin 1883
- 20) Katz, S.L.; Wilfert, C.M.: New thoughts on pertussis. *Pediatrics* 63, 941-942 (1979)
- 21) Keller, M.A.; Aftandelians, R.; Connor, J.D.: etiology of pertussis syndrome. *Pediatrics*, 66, 50 (1980)
- 22) Klenk, E.L., Gaultney, J.V. and Bass J.W.: Bacteriologically proved pertussis and adenovirus infection: possible association, *Am. J. Dis. Child* 124: 203 (1972)
- 23) Krugman, S.; Katz, S.: *Pertussis (whooping cough)*. *Inf. Dis. Child*, 7th edition (1981)
- 24) Lapin, J.H.: *Whooping cough*. Springfield, Ill., C.C. Thomas, Publisher (1943)

- 25) Malleon, P.N.; Bennett, J.C.: Whooping cough admissions to a pediatric hospital over ten years. The protective value of immunisation. *Lancet* 1, 237-239 (1977)
- 26) Mertsola, J.; Ruuskanen, O.; Kuronen, T.; Viljanen, M.K.: Serologic diagnosis of pertussis: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and bacterial agglutination. *J. infect. Dis.* 147, 252-257 (1983)
- 27) Miller, L.; Ross, E.M.; Alderslade, R.; Bellman, M.H.; Rawson, N.S.B.: Pertussis immunisation and serious acute neurological illness in children. *Br. Med. J.*, 282, 1595 (1981)
- 28) Mishulow, L.; Siegel, M.; Leifer, L.; Berkey, S.R.: A study of pertussis antibodies. Protective, agglutinating and complementfixing antibodies in patients with pertussis, persons exposed to pertussis and persons with no known exposure. *Am. J. Dis. Child* 63: 875-890 (1942)
- 29) Mittelstaedt, W.: Über angeborenen Keuchhusten. *Kinderärztliche Praxis* 10, 270-271 (1939)
- 30) Nelson, J.D.: The changing epidemiology of pertussis in young infants. The role of adults as reservoirs of infection. *Am. J. Dis. Child.* 132, 371-373 (1978)
- 32) PAIS: Nimmt der Keuchhusten wieder zu? 14-15, (1982)
- 33) Pereira, M.S.; Candeias, J.W.: The associations of viruses with clinical pertussis. *J. Hyg.* 69, 399 (1971)

- 34) Pesce, A.J.; Ford, D.J., Gaizutis, M.A.: Qualitative and quantitative aspects of immunoassay. Scand. J. Immunol. 1-6 (1978)
- 35) Public Health Laboratory Service: Diagnosis of whooping cough: comparison of serological tests with isolation of *Bordetella pertussis*. A combined Scottish study. Br. Med. J. 4: 637-639 (1970)
- 36) Saran, G.; Angra, S.S.; Balasubrahmanyam, M.: Antibody against whooping cough in normal population. Indian J. Med. Res. 70, 5-12 (1979)
- 37) Stewart, G.T.: Vaccination against whooping cough: efficacy versus risks. Lancet 1: 234-237 (1977)
- 38) Sturdy, P.M.; Court, S.D.M. and Gardner, P.S.: Viruses and whooping cough, Lancet 2 : 978 (1971)
- 39) Viljanen, M.; Ruuskanen, O.; Grauberg, C.; Salmi, T.T.: Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Scand. J. Infect. Dis. 14 (117-122 (1982)
- 40) Wiesmann, E.: Medizinische Mikrobiologie, 177, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1982

LEBENS LAUF

Am 26. März 1960 wurde ich, Christine K ö n i g , als erstes Kind des Professors Dr. med. Kurt König und seiner Ehefrau Dr. med. Karin König, geb. Bergstrand, in Freiburg geboren.

Nach Besuch der Volksschule von 1966 - 1970 wechselte ich auf das humanistisch ausgerichtete Friedrich-Gymnasium in Freiburg, wo ich im Mai 1979 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1979 war ich an der Universität Freiburg für das Fach Germanistik eingeschrieben. Im Sommersemester 1980 begann ich mein Medizinstudium in Freiburg. Nach dem ersten vorklinischen Semester wechselte ich an die Ludwig-Maximilians-Universität nach München über. Dort bestand ich im WS 1981/82 das Physikum und im WS 1982/83 das erste Staatsexamen.

